氟啶虫胺腈对意大利蜜蜂解毒、免疫和记忆相关基因表达的亚致死效应*

施腾飞** 王安然** 朱玉洁 余林生***

（安徽农业大学，合肥 230036）

摘 要 【目的】 新型杀虫剂氟啶虫胺腈广泛用于农业生产中的害虫防治，但其对蜜蜂健康影响的研究较少。本文探究了亚致死剂量的噻虫啉对意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 6 种解毒相关基因（*CYP9Q1*、*CYP9Q2*、*CYP9Q3*、*CYP9S1*、*CYP6AS5* 和 *CYP4G11*）、4 种免疫相关基因（*Abaecin*、*Defensin*、*Hymenoptaeci* 和 *Apidaecin*）和 3 种记忆相关基因（*PKA*、*GluRA* 和 *NMDAR1*）表达的影响。**【方法】** 采用饲喂法确定氟啶虫胺腈对蜜蜂的经口急性毒性；并用 1/3 LD_{50} 和 1/10 LD_{50} 氟啶虫胺腈饲喂蜜蜂后 48 h，运用荧光定量 PCR 技术分别检测了蜜蜂脑部解毒、免疫和记忆相关基因的表达变化，并统计各组蜜蜂的死亡率。**【结果】** 氟啶虫胺腈对蜜蜂经口性半数致死剂量 LD_{50} 为 0.099 μg/蜂；饲喂 1/3 LD_{50} 氟啶虫胺腈能够显著抑制蜜蜂 *Abaecin* 和 *Defensin* 的表达（$P < 0.05$），而 *PKA*、*NMDAR1*、*GluRA*、*CYP9Q2* 和 *CYP9Q3* 能够被其诱导上调表达（$P < 0.05$）；饲喂 1/3 LD_{50} 和 1/10 LD_{50} 氟啶虫胺腈均能显著诱导蜜蜂 *Hymenoptaecin*、*Apidaecin*、*CYP6AS5* 和 *CYP4G11* 上调表达（$P < 0.05$）。但饲喂 1/3 LD_{50} 和 1/10 LD_{50} 氟啶虫胺腈的处理均不影响蜜蜂 *CYP9Q1* 和 *CYP9S1* 表达。**【结论】** 氟啶虫胺腈的曝露可能会对意大利蜜蜂的免疫、记忆和解毒系统都有一定的影响，这对深入探究氟啶虫胺腈与蜜蜂之间互作的分子机制有一定生物学意义。

关键词 意大利蜜蜂；氟啶虫胺腈；解毒相关基因；免疫相关基因；记忆相关基因

Sublethal effects of sulfoxaflor on the expression of detoxification, immune and memory related, genes in the honeybee (*Apis mellifera ligustica*)

SHI Teng-Fei** WANG An-Ran** ZHU Yu-Jie YU Lin-Sheng***

(Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract [Objectives] The new insecticide sulfoxaflor is widely used to control insect pests but little is known about its effects on honeybees (*Apis mellifera ligustica*). The sublethal effects of sulfoxaflor on the expression of six detoxification (*CYP9Q1*, *CYP9Q2*, *CYP9Q3*, *CYP9S1*, *CYP6AS5* and *CYP4G11*), four immune (*Abaecin*, *Defensin*, *Hymenoptaeci* and *Apidaecin*), and three memory (*PKA*, *GluRA* and *NMDAR1*), related genes in honeybees was investigated. **[Methods]** (1) The LD_{50} value of sulfoxaflor to honeybees was assessed using the "oral-feeding tube" method. (2) Changes in the expression of six detoxification, four immune, and three memory related genes were measured 48 h after bees had been fed sublethal doses (1/3 LD_{50} and 1/10 LD_{50}) of sulfoxaflor. **[Results]** (1) The LD_{50} value of sulfoxaflor to honeybees was 0.099 μg/bee. (2) Exposure to 1/3 LD_{50} of sulfoxaflor significantly inhibited *Abaecin* and *Defensin* expression in honeybees ($P < 0.05$), but up-regulated the expression of *PKA*, *NMDAR1*, *GluRA*, *CYP9Q2* and *CYP9Q3* ($P < 0.05$). The expression levels of *Hymenoptaecin*, *Apidaecin*, *CYP6AS5* and *CYP4G11* in both treatment groups were significantly higher than in the control group. Sulfoxaflor did not, however, affect the expression of *CYP9Q1* and *CYP9S1*. **[Conclusion]** Sulfoxaflor could potentially affect the detoxification, immune and memory systems of honeybees. These results provide a basis for further exploring the complex

*资助项目 Supported projects：现代农业蜂产业技术体系建设专项资金（CARS-45-KXJ10）

**共同第一作者 First author，E-mail：stf0623@163.com；aimyon01@163.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：yulinshengahau@163.com

收稿日期 Received：2019-12-27；接受日期 Accepted：2020-05-11

molecular interactions between sulfoxaflor and honeybees.

Key words *Apis mellifera ligustica*; sulfoxaflor; detoxification related gene; immune related gene; memory related gene

蜜蜂是重要的社会性经济昆虫，它们不仅为人类提供丰富多样的蜂产品，例如蜂蜜、蜂花粉和蜂王浆等，而且还能为农作物和野生植物提供授粉服务，在维持生态系统多样性方面扮演着重要的角色（Klein *et al.*，2007）。然而，近年来蜜蜂种群的不断下降引起了国内外的关注。尽管导致蜂群下降的具体原因换不明了，不过有很多专家和学者表示农业生产中农药的大量使用可能是引起这种现象的最重要的原因之一（Goulson *et al.*，2015；Schmuck and Lewis，2016）。

研究表明农药的曝露不仅会损害蜜蜂的组织发育和生理，而且还能够影响它们的各种行为。新烟碱类农药是当今世界上应用最广泛的一类杀虫剂，研究表明亚致死剂量新烟碱杀虫剂（如吡虫啉、噻虫嗪和噻虫啉等）不仅能够损害蜜蜂脑部和中肠的发育（Oliveira *et al.*，2014；Peng and Yang，2016；Catae *et al.*，2019），还会降低它们的学习记忆（Alkassab and Kirchner，2016；施腾飞等，2018）、采集和归巢飞行能力（Henry *et al.*，2012；Tison *et al.*，2016；Monchanin *et al.*，2019）。此外，其他一些常用的杀虫剂，比如一些拟除虫菊酯类和有机磷类农药也能够影响蜜蜂的健康。Li 等（2017）研究表明有机磷农药毒死蜱（1/2 LD_{50}）处理蜜蜂后能够损害其嗅觉联想学习和记忆能力。Liao 等（2017）通过室内和半田间实验发现甲氰菊酯的曝露能够降低蜜蜂的生存和归巢飞行能力。Wang 等（2017）报道称低剂量的溴氰菊酯可能通过损害蜜蜂脑部细胞 T 型钙离子通道而导致其饲喂、采集和分蜂等行为的畸形。

近年来由于各种害虫对常用的新烟碱类、拟除虫菊酯类和有机磷类等农药抗性的产生（Whalon *et al.*，2008），很多新型农药逐渐被用于农业害虫的防治，其中就有氟啶虫胺腈。氟啶虫胺腈是一种砜亚胺类杀虫剂，它主要作用于昆虫的神经系统，能够竞争性的调节烟碱型乙酰胆碱受体，而使昆虫兴奋麻痹致死（Sparks *et al.*，2013）。近年有调查发现了氟啶虫胺腈在蜂花粉中的残留（Zhu *et al.*，2017）。目前关于氟啶虫胺腈对蜜蜂健康影响的报道很少，最新发表在 Nature 上的一篇研究显示长期氟啶虫胺腈的曝露能够降低欧洲熊蜂 *Bombus terrestris* 种群的繁殖成功率（Siviter *et al.*，2018）。

本文作者主要研究了氟啶虫胺腈处理对意大利蜜蜂解毒、免疫和记忆相关基因表达的影响，以期能够初步探究氟啶虫胺腈与蜜蜂之间互作的分子机制，并为这种杀虫剂在蜜源植物上的使用提供一定的指导。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

主要试剂和药品：增强版荧光定量预混试剂盒（SYBR Green）（天根，中国北京）、去基因组逆转录反应试剂盒（东洋纺，中国上海）、Trizol（天根）和原药氟啶虫胺腈（百灵威，中国北京）。主要仪器：高速冷冻离心机（艾本德，中国上海）、StepOnePlus 实时荧光定量 PCR 仪（赛默飞，中国上海）和 NanoDrop2000 超微量分光光度计（赛默飞）。

1.2 虫源

本研究中使用到的蜜蜂均采自于安徽农业大学种蜂场，蜂场内的蜜蜂在试验期间均是健康的，没有接触过任何农药的曝露。为了获得同日龄的蜜蜂，从一个群势较强的蜂群中取出一张即将出房的封盖子蜂脾，并带回实验室放在恒温恒湿气候箱中进行培养。培养箱设置为：黑暗，33 ℃，相对湿度（Relative humidity，RH）60%。放置 12 h 后，收集足够的刚羽化蜜蜂（定义为 1 日龄）并移至塑料蜂笼（10 cm×9 cm × 8 cm）中，并把这些蜜蜂平均分配到 9 个蜂笼中，然后放回到气候箱中饲养，培养条件为：黑暗，28 ℃，RH 70%。每天对各笼蜜蜂提供充足的 50%糖水和花粉，并及时清除死蜂。培养 4 d 后，选择 5

日龄蜜蜂用于急性毒性和亚致死处理试验。

1.3　急性毒性测定

氟啶虫胺腈母液的配置方法：先量取 5 mL 丙酮于棕色瓶中，然后加入 50 mg 的氟啶虫胺腈原药并混合均匀，其浓度为 1×10^4 mg/L，并将配置好的农药母液放置在－20 ℃的冰箱中保存备用。根据前期的预试验结果，我们选取 5 个系列浓度：10、7.5、5、3.75 和 2.5 mg/L 氟啶虫胺腈用于蜜蜂经口急性毒性测定。分别取适量的氟啶虫胺腈母液溶于 50%的糖水中，配置成以上 5 个系列浓度，并保证丙酮在糖水中的体积比为 0.1%，然后将只含有 0.1%丙酮的 50%糖水作为对照。取 180 头健康的、大小一致的 5 日龄蜜蜂在氮气条件下麻醉 1 min，然后平均分到 18 个塑料蜂笼中，并置于气候箱中培养。每个浓度处理组和对照组均有 3 笼蜜蜂（3 个重复）。将所有苏醒后的蜜蜂进行饥饿处理 2 h 后，分别使用饲喂槽饲喂 200 μL 上述浓度的农药和 50%糖水，自由取食 4 h 后，待所有蜜蜂将糖水都消耗尽，则每个农药处理组和对照组每头蜜蜂食用平均农药量分别为 0.2、0.15、0.1、0.075、0.05 和 0 μg。然后将受到污染的饲喂槽取出，并对每笼蜜蜂饲喂足量纯净的 50%糖水和花粉，饲喂 48 h 后，记录和统计每组蜜蜂死亡数。

1.4　亚致死剂量处理

本研究选用 1/3 LD_{50} 和 1/10 LD_{50} 作为处理的亚致死剂量。分别取适量的氟啶虫胺腈母液溶于 50%的糖水中，配置成 1.67 mg/L 和 0.5 mg/L，并保证丙酮在糖水中的体积比为 0.1%，然后将只含有 0.1%丙酮的 50%糖水作为对照。取 270 头健康、大小一致的 5 日龄蜜蜂在氮气条件下麻醉 1 min，然后平均分到 9 个塑料蜂笼中，并放到气候箱中培养。每个亚致死浓度处理组和对照组均有 3 笼蜜蜂（3 个重复）。将所有苏醒后的蜜蜂进行饥饿处理 2 h 后，分别使用饲喂槽饲喂 600 μL 含有上述浓度的农药和 50%糖水，自由取食 4 h 后，待所有蜜蜂将糖水都消耗尽，则每农药处理组和对照组每头蜜蜂食用平均农药量分别为 0.033（1/3 LD_{50}）、0.01（1/10 LD_{50}）和 0 μg（对照组）。然后将受到污染的饲喂槽取出，并对每笼蜜蜂饲喂足量的纯净的 50%糖水和花粉，这样饲喂 48 h 后，记录和统计每组蜜蜂死亡数，并收集剩余的活蜂用于后续基因检测试验。

1.5　总 RNA 的提取及反转录反应

首先将 1.3 中收集到的蜜蜂在氮气中麻醉 1 min，然后使用去酶处理的医用手术刀和尖镊子等在体式显微镜下解剖蜜蜂头部，去除王浆腺和复眼等组织，获得脑部。取干净的 1.5 mL 离心管加入 500 μL 的 Trizol，然后加入 10 个蜜蜂脑部，用电动研磨棒研磨均匀后，提取总 RNA。然后运用超微量分光光度计检测确定提取总 RNA 的浓度，并将其稀释到 500 ng/μL，用于接下来的反转录反应，具体步骤如下。取 1 μL 500 ng/μL 的总 RNA 于 0.2 mL 离心管中，在 65 ℃孵育 5 min 后，立即置于冰上速冷 1 min，然后加入 2 μL 4x DN Master Mix（已添加 gDNA Remover）和 5 μL 无酶水，混匀后在在 37 ℃条件下温育 5 min，最后加入 2 μL 5x RT Master Mix II，混匀后在以下条件进行反应：37 ℃, 15 min；50 ℃, 5 min；98 ℃, 5 min，结束后得到 cDNA 第一链。

1.6　引物的设计与合成

本研究中使用到的目的基因和内参基因的上下引物委托上海捷瑞生物工程有限公司合成，引物的序列信息见表 1。

1.7　荧光定量 PCR

对 1.5 中得到 cDNA 进行 5 倍稀释，然后以此作为模板进行荧光定量 PCR 反应。取八连管放在冰上，然后依次加入 1 μL cDNA 模板；上下游引物（10 $\mu mol\cdot L^{-1}$）各 0.6 μL；2 μL 50 × ROX Reference Dye；5.8 μL 无酶水和 10 μL 2 × SuperReal PreMix Plus，并以体系全部为无酶水作为空白对照，而以无酶水代替模板作为阴性对照，每个反应体系都设置 3 个重复，混匀后进行 PCR 反应。反应条件如下：首先在 95 ℃下预变性 15 min；然后是 40 个循环的扩增反应：95 ℃ 10 s，60 ℃ 20 s，72℃ 30 s；最后是溶解曲线的生成。本研究中我们以 *RpS5* 作为内参基因，

表 1 本研究中用到的上下游引物序列

Table 1 The sequences of forward and reverse primers of genes used in the present study

基因 Genes	引物序列（5′-3′） Primer sequences (5′-3′)	基因 Genes	引物序列（5′-3′） Primer sequences (5′-3′)
CYP9Q1	F: TCGAGAAGTTTTTCCACCG	*Apidaecin*	F: TTTTGCCTTAGCAATTCTTGTTG
	R: CTCTTTCCTCCTCGATTG		R: GAAGGTCGAGTAGGCGGATCT
CYP9Q2	F: GATTATCGCCTATTATTACTG	*CYP9S1*	F: CTAATTTTCGCGTTCCCAAA
	R: GTTCTCCTTCCCTCTGAT		R: CTCCCGTTACGTTTGTCGAT
CYP9Q3	F: GTTCCGGGAAAATGACTAC	*CYP4G11*	F: CAAAATGGTGTTCTCCTTACCG
	R: GGTCAAAATGGTGGTGAC		R: ATGGCAACCCATCACTGC
CYP6AS5	F: CAGGCTCTCCCCAATATTCA	*PKA*	F: AAGACTATTGAAGTCGGTGACA
	R: TCGATGGGCTCATTTTTCTC		R: CCTATCAAGGCCCCACCAAA
Abaecin	F: TGTCGGCCTTCTCTTCATGG	*NMDAR1*	F: GTATTTCCGTCGCCAAGTC
	R: TGACCTCCAGCTTTACCCAAA		R: TGTAAACCAATCCCATAGCCA
Hymenoptaecin	F: ATATCCCGACTCGTTTCCGA	*GluRA*	F: ACTCTGTTCGTCTGTGGGGTC
	R: TCCCAAACTCGAATCCTGCA		R: TTCGTTAGAAGGGCAGCGTA
Defensin	F: TGCGCTGCTAACTGTCTCAG	*RpS5*	F: AATTATTTGGTCGCTGGAATTG
	R: AATGGCACTTAACCGAAACG		R: TAACGTCCAGCAGAATGTGGTA

并利用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法（Schmittgen and Livak，2008）对目的基因相对表达水平进行校正。

1.7 数据分析

氟啶虫胺腈对蜜蜂的半数致死剂量（LD_{50}）及 95%置信区间运用 SPSS Statistics 软件中的概率回归单位（Probit）进行计算；各组蜜蜂死亡率和基因表达差异运用单因素方差分析（ANOVA）进行计算，而显著性差异则运用 Duncan 氏法进行检验；运用 GraphPad Prism 5 软件制作文中的图形。

2 结果与分析

2.1 急性毒性

根据毒力测定结果，本研究得出了氟啶虫胺腈对蜜蜂的经口性半数致死剂量 LD_{50} 为 0.099 μg/蜂，属于高毒的（表 2）。

表 2 氟啶虫胺腈对蜜蜂的经口性毒性

Table 2 LD_{50} value of sulfoxaflor to honeybee (*Apis mellifera ligustica*) by oral-feeding

农药 Pesticide	时间 Time	毒力回归方程 Regression equation	LD_{50}（95%置信区间，95% CL）（μg/蜂）
氟啶虫胺腈 Sulfoxaflor	48 h	$y = 4.694 + 4.67x$	0.099（0.087-0.111）

2.2 亚致死效应

2.2.1 对蜜蜂生存的影响 蜜蜂取食亚致死剂量农药后，在恒温恒湿培养箱中继续培养 48 h 后记录各组蜜蜂的死亡数。最初各组蜜蜂数均为 30 头，48 h 后蜜蜂死亡数记为 *Nd*，则蜜蜂生存率则为：$y = (30 - Nd)/30 \times 100\%$。由图 1 可知，对照组没有蜜蜂死亡，而 1/3 LD_{50} 和 1/10 LD_{50} 剂量的氟啶虫胺腈处理均不影响蜜蜂的生存。

2.2.2 对蜜蜂基因表达的影响 本研究以丙酮组蜜蜂作为对照组，检测了 1/3 LD_{50} 和 1/10 LD_{50} 剂量的氟啶虫胺腈经口处理对蜜蜂解毒、免疫和记忆相关基因表达的影响。

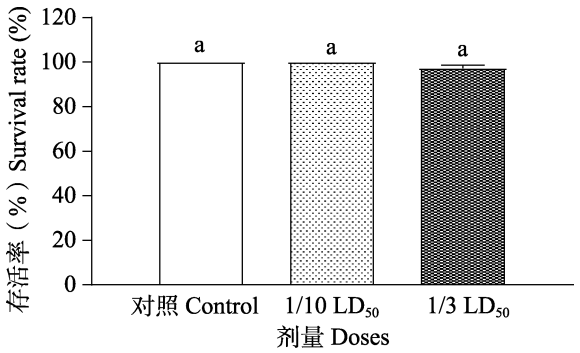

图 1　各组蜜蜂的存活率

Fig. 1　Probability of survival of honeybees (*Apis mellifera ligustica*) in different groups

图中数据为平均值±标准误；柱上标有相同字母表示差异不显著（$P > 0.05$），标有不同字母表示差异显著（$P < 0.05$）。下图同。

Data are mean±SE. Histograms with the same letters indicate no significant difference ($P > 0.05$), while with different letters indicate significant difference ($P < 0.05$). The same below.

由图 2 可知，1/3 LD_{50} 和 1/10 LD_{50} 剂量的氟啶虫胺腈处理均能诱导蜜蜂 *CYP6AS5* 和 *CYP4G11* 的上调表达（$P < 0.05$），而蜜蜂 *CYP9Q2* 和 *CYP9Q3* 仅能被 1/3 LD_{50} 剂量的氟啶虫胺腈诱导上调表达（$P < 0.05$）。此外，亚致死剂量氟啶虫胺腈胁迫不会影响蜜蜂 *CYP9Q1* 和 *CYP9S1* 的表达。

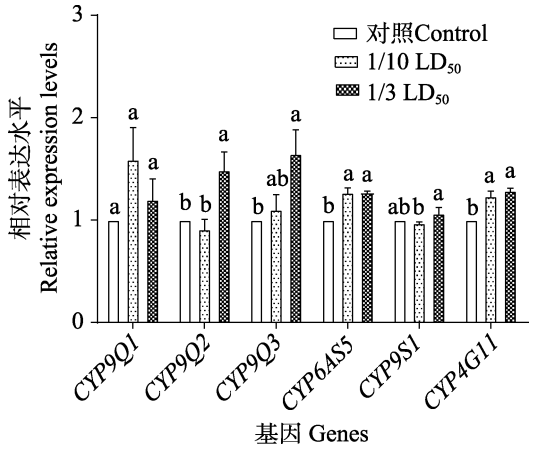

图 2　氟啶虫胺腈对蜜蜂 6 种解毒相关基因表达的影响

Fig. 2　Effects of sulfoxaflor on six detoxification related genes in honeybees (*Apis mellifera ligustica*)

由图 3 可知，1/3 LD_{50} 和 1/10 LD_{50} 剂量的氟啶虫胺腈处理均能显著抑制蜜蜂 *Abaecin* 的表达（$P < 0.05$），而 1/3 LD_{50} 剂量的氟啶虫胺腈处理蜜蜂 *Defensin* 的表达水平也显著低于对照组（$P < 0.05$）。蜜蜂 *Hymenoptaecin* 和 *Apidaecin* 均能被 1/3 LD_{50} 和 1/10 LD_{50} 剂量的氟啶虫胺腈诱导上调表达，值得注意的是 1/3 LD_{50} 剂量的氟啶虫胺腈处理蜜蜂 *Hymenoptaecin* 的表达水平与对照相比增加了 70 多倍。

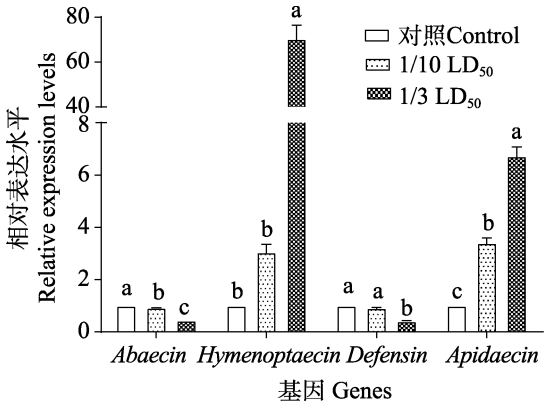

图 3　氟啶虫胺腈对蜜蜂 4 种免疫相关基因表达的影响

Fig. 3　Effects of sulfoxaflor on four immune related genes in honeybees (*Apis mellifera ligustica*)

由图 4 可知，1/3 LD_{50} 剂量的氟啶虫胺腈处理能够诱导蜜蜂记忆相关基因 *PKA*、*NMDAR1* 和 *GluRA* 上调表达（$P < 0.05$），而 1/10 LD_{50} 剂量的氟啶虫胺腈处理则对这 3 种基因的表达没有显著的影响。

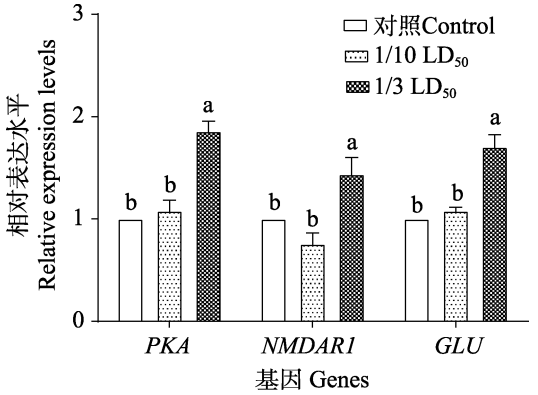

图 4　氟啶虫胺腈对蜜蜂 3 种记忆相关基因表达的影响

Fig. 4　Effects of sulfoxaflor on three memory related genes in honeybees (*Apis mellifera ligustica*)

3　讨论

氟啶虫胺腈作为一种新型的杀虫剂，近年来

广泛用于多种害虫的防治，有关氟啶虫胺腈对重要的经济传粉昆虫——蜜蜂健康影响方面的研究还非常少。在本研究中，我们首先检测了氟啶虫胺腈对意大利蜜蜂的经口性急性毒性，结果显示其对意蜂的半数致死剂量为 $LD_{50(48\cdot h)}$ = 0.099 μg/蜂，按《化学农药环境安全评价试验准则》中毒性等级划分标准可知氟啶虫胺腈对蜜蜂是高毒的，这与吴声敢等（2017）的研究是一致的。虽然有些农药对蜜蜂的毒性很强，但是在其施到田间经过雨水日晒和代谢等过程后，农药在花蜜和花粉中的残留量是不足以导致蜜蜂急性致死，但对蜜蜂的亚致死效应是不容忽视的。因此，本文探究了亚致死剂量（1/3 LD_{50} 和 1/10 LD_{50}）的氟啶虫胺腈对蜜蜂 6 种解毒相关基因、4 种免疫相关基因和 3 种记忆相关基因表达的影响。

细胞色素 P450 单氧酶（Cytochrome P450 monooxygenase，CYP）是昆虫体内重要的多功能解毒酶，它不仅参与昆虫体内各种内激素和外信息素的合成与代谢（Feyereisen，2006），而且在对杀虫剂的解毒和代谢过程中发挥着重要的作用（Li *et al.*，2007）。虽然与其他昆虫如黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 相比，西方蜜蜂体内的 CYP 基因数相对较少（Tijet *et al.*，2001），不过这些基因在蜜蜂对农药和其他异源物质的解毒和代谢过程中发挥着重要作用。Mao 等（2011）研究表明 CYP3 家族中 *CYP9Q1*、*CYP9Q2* 和 *CYPQ3* 能够将氟胺氰菊酯代谢成易于羧酸酯酶分解的代谢物，从而可以增强蜜蜂对这种杀螨剂的耐受性。Manjon 等（2018）报道称蜜蜂 *CYPQ3* 能够高效率的代谢新烟碱类杀虫剂噻虫啉。蜜蜂 *CYP9S1*、*CYP4G11* 和 *CYP6AS5* 也均属于 CYP3 家族，其中 *CYP4G11* 特异性在采集蜂中高表达（Mao *et al.*，2015），其在蜜蜂的卫生行为（Gregorc *et al.*，2012）和抗氧化过程中（Shi *et al.*，2013）可能发挥着重要的作用。*CYP6AS5* 属于 CYP6AS 亚家族，这个家族基因特异性存在于膜翅目昆虫中，由于这个家族的基因能被蜂蜜、花粉和蜂胶诱导上调表达而被认为可能参与蜜蜂食物中某些外源物质的代谢（Mao *et al.*，2009；Johnson *et al.*，2012）。*CYP6AS5* 能够被噻虫啉诱导上调表达而被认为在蜜蜂对这种农药的解毒过程中发挥了一定作用（Alptekin *et al.*，2016）。本研究结果中显示的 *CYP9Q2*、*CYPQ3*、*CYP6AS5* 和 *CYP4G11* 能够被氟啶虫胺腈诱导上调表达，预示着这些基因可能参与到蜜蜂对氟啶虫胺腈的解毒和代谢过程中。

抗菌肽是昆虫先天免疫系统的重要组成部分，Apidaecin、Abaecin、Hymenoptaecin 和 Defensin 是蜜蜂体内的主要的 4 大抗菌肽家族（Casteels *et al.*，1989，1990，1993；Casteels and Tempst，1994），它们在蜜蜂体内主要扮演着抑制和清除细菌和真菌和寄生虫等致病异源物质的角色（Casteels *et al.*，1989，1993；Evans，2004；Aronstein and Salivar，2005；Randolt *et al.*，2008；Chan *et al.*，2009；Richard *et al.*，2012；Danihlík *et al.*，2015）。James 和 Xu（2012）研究表明杀虫剂能够通过增加昆虫的免疫压力而达到毒害昆虫的作用，并增加病虫害对昆虫的致病性。本研究结果显示氟啶虫胺腈能够抑制 *Defensin* 和 *Abaecin* 的表达，推测其可能会破坏蜜蜂的先天免疫系统。另外有意思的是，其他两个抗菌肽基因 *Hymenoptaecin* 和 *Defensin* 均能被氟啶虫胺腈诱导上调表达，其中 *Hymenoptaecin* 的表达量最高增加了 70 多倍，不过目前还没有关于蜜蜂抗菌肽对农药具有防御作用方面的研究，这值得我们下一步进行深入的探究。

N-甲基-D 天冬氨酸受体（NMDA glutamate receptors，NMDARs）是蜜蜂中枢神经系统内与记忆形成相关的重要氨基酸受体（Kandel，2001；Si *et al.*，2004），而 NMDAR1 是组成 Nmdars 的一个重要亚基，其广泛存在于蜜蜂的脑部（Zannat *et al.*，2006），并在蜜蜂中期和长期记忆的形成过程中起着重要的作用（Müßig *et al.*，2010）。蜜蜂促代谢性谷氨酸受体（Glutamate receptor，GluRA）主要通过偶联膜内 G-蛋白进行激活，并作用于由脑内第二信使和 G-蛋白效应酶等组成的信号转导系统，参与蜜蜂的学习记忆（Kucharski *et al.*，2007）。环腺苷酸依赖性

蛋白激酶（cAMP-dependent kinase，PKA）能够调控蜜蜂体内包括长期记忆形成在内的多重细胞进程（Friedrich *et al.*，2004）。本研究发现 *NMDAR1*、*GluRA* 和 *PKA* 这 3 种基因均能被氟啶虫胺腈诱导上调表达，这预示着低剂量氟啶虫胺腈的急性曝露可能对蜜蜂的记忆能力具有一定的促进作用，这一结论还需要深入的行为学试验进行验证。

综上所述，氟啶虫胺腈的曝露可能会对意大利蜜蜂的免疫、记忆和解毒系统都有一定的影响，这对深入探究氟啶虫胺腈与蜜蜂之间互作的分子机制有一定生物学意义。

参考文献 (References)

Alkassab AT, Kirchner WH, 2016. Impacts of chronic sublethal exposure to clothianidin on winter honeybees. *Ecotoxicology*, 25(5): 1000–1010.

Alptekin S, Bass C, Nicholls C, Paine MJ, Clark SJ, Field L, Moores GD, 2016. Induced thiacloprid insensitivity in honeybees (*Apis mellifera* L.) is associated with up-regulation of detoxification genes. *Insect Mol. Biol.*, 25(2): 171–180.

Casteels P, Ampe C, Jacobs F, Tempst P, 1993. Functional and chemical of hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is infection-inducible in the honeybee (*Apis mellifera*). *J. Biol. Chem.*, 268(10): 7044–7054.

Casteels P, Ampe C, Jacobs F, Vaeck M, Tempst P, 1989. Apidaecins: Antibacterial peptides from honeybees. *Embo J.*, 8(8): 2387–2391.

Casteels P, Ampe C, Riviere L, Van Damme J, Elicone C, Fleming M, Jacobs F, Tempst P, 1990. Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *Eur. J. Biochem.*, 187(2): 381–386.

Casteels P, Tempst P, 1994. Apidaecin-type peptide antibiotics function through a non-poreforming mechanism involving stereospecificity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 199(1): 339–345.

Catae AF, Menegasso ARD, Pratavieira M, Palma MS, Malaspina O, Roat TC, 2019. MALDI-imaging analyses of honeybee brains exposed to a neonicotinoid insecticide. *Pest Manag. Sci.*, 75(3): 607–615.

Chan QWT, Melathopoulos AP, Pernal SF, Foster LJ, 2009. The innate immune and systemic response in honey bees to a bacterial pathogen, *Paenibacillus* larvae. *BMC Genomics*, 10: 387.

Danihlík J, Aronstein K, Petřivalský M, 2015. Antimicrobial peptides: A key component of honey bee innate immunity. *J. Apicult. Res.*, 54(2): 123–136.

Evans JD, 2004. Transcriptional immune responses by honey bee larvae during invasion by the bacterial pathogen, *Paenibacillus* larvae. *J. Invertebr. Pathol.*, 85(2): 105–111.

Feyereisen R, 2006. Evolution of insect P450. *Biochem. Soc. Trans.*, 34(6): 1252–1255.

Friedrich A, Thomas U, Müller U, 2004. Learning at different satiation levels reveals parallel functions for the cAMP-protein kinase a cascade in formation of long-term memory. *J. Neurosci.*, 24(18): 4460–4468.

Goulson D, Nicholls E, Botías C, Rotheray EL, 2015. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347(6229): 1255957.

Gregorc A, Evans JD, Scharf M, Ellis JD, 2012. Gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) larvae exposed to pesticides and *Varroa mites* (*Varroa destructor*). *J. Insect Physiol.*, 58(8): 1042–1049.

Henry M, Béguin M, Requier F, Rollin O, Odoux JF, Aupinel P, Aptel J, Tchamitchian S, Decourtye A, 2012. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science*, 336(6079): 348–350.

James RR, Xu J, 2012. Mechanisms by which pesticides affect insect immunity. *Journal of Invertebrate Pathology*, 109(2): 175–182.

Johnson RM, Mao W, Pollock HS, Niu G, Schuler MA, Berenbaum MR, 2012. Ecologically appropriate xenobiotics induce cytochrome P450s in *Apis mellifera*. *PLoS ONE*, 7(2): e31051.

Kandel ER, 2001. The molecular biology of memory storage: A dialogue between genes and synapses. *Science*, 294(5544): 1030–1038.

Klein AM, Vaissiere BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C, Tscharntke T, 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. R. Soc. B.*, 274(1608): 303–313.

Kucharski R, Mitri C, Grau Y, Maleszka R, 2007. Characterization of a metabotropic glutamate receptor in the honeybee (*Apis mellifera*): Implications for memory formation. *Invert. Neurosci.*, 7(2): 99–108.

Liao CH, Wu J, Wang ZL, Zeng ZJ, Wu XB, 2017. Effect of fenpropathrin on the viability and homing ability of worker bees *Apis mellifera*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 20(4): 1063–1066.

Li X, Schuler MA, Berenbaum MR, 2007. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu. Rev. Entomol.*, 52: 231–253.

Manjon C, Troczka BJ, Zaworra M, Beadle K, Randall E, Hertlein G, Singh KS, Zimmer CT, Homem RA, Lueke B, Reid R, Kor L,

Kohler M, Benting J, Williamson MS, Davies TGE, Field LM, Bass C, Nauen R, 2018. Unravelling the molecular determinants of bee sensitivity to neonicotinoid insecticides. *Curr. Biol.*, 28(7): 1137–1143.

Mao WF, Rupasinghe SG, Johnson RM, Zangerl AR, Schuler MA, Berenbaum MR, 2009. Quercetin-metabolizing CYP6AS enzymes of the pollinator *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 154(4): 427–434.

Mao WF, Schuler MA, Berenbaum MR, 2011. CYP9Q-mediated detoxification of acaricides in the honey bee (*Apis mellifera*). *PNAS*, 108(31): 12657–12662.

Monchanin C, Henry M, Decourtye A, Dalmon A, Fortini D, Bœuf E, Dubuisson L, Aupinel P, Chevallereau C, Petit J, Fourrier J, 2019. Hazard of a neonicotinoid insecticide on the homing flight of the honeybee depends on climatic conditions and *Varroa* infestation. *Chemosphere*, 224: 360–368.

Müßig L, Richlitzki A, Rößler R, Eisenhardt D, Menzel R, Leboulle G, 2010. Acute disruption of the NMDA receptor subunit NR1 in the honeybee brain selectively impairs memory formation. *J. Neurosci.*, 30(23): 7817–7825.

Oliveira RA, Roat TC, Carvalho SM, Malaspina O, 2014. Side effects of thiamethoxam on the brain and midgut of the Africanized honeybee *Apis mellifera* (Hymenopptera: Apidae). *Environ. Toxicol.*, 29(10): 1122–1133.

Peng YC, Yang EC, 2016. Sublethal dosage of imidacloprid reduces the microglomerular density of honey bee mushroom bodies. *Sci. Rep.*, 6: 19298.

Randolt K, Gimple O, Geissendorfer J, Reinders J, Prusko C, Mueller M, Beier H, 2008. Immune-related proteins induced in the hemolymph after aseptic and septic injury differ in honeybee worker larvae and adults. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 69(4): 155–167.

Richard FJ, Holt HL, Grozinger CM, 2012. Effects of immune stimulation on social behavior, chemical communication and genome-wide gene expression in honey bee workers (*Apis mellifera*). *BMC Genomics*, 13: 558.

Schmuck R, Lewis G, 2016. Review of field and monitoring studies investigating the role of nitro-substituted neonicotinoid insecticides in the reported losses of honey bee colonies (*Apis mellifera*). *Ecotoxicology*, 25(9): 1617–1629.

Schmittgen TD, Livak KJ, 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6): 1101–1108.

Shi TF, Wang YF, Burton S, Xu SY, Deng QY, Zhang WX, Yu LS, 2018. Effects of thiacloprid on the expression of major royal jelly protein genes, and immune and memory related genes, in the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Chinese Journal of Applied Entomology*, 55(4): 659–666. [施腾飞, 王宇飞, Burton Sawyer, 许圣云, 邓全艺, 章文信, 余林生, 2018. 噻虫啉对西方蜜蜂王浆主蛋白、免疫和 记忆相关基因表达的影响. 应用昆虫学报, 55(4): 659–666.]

Shi W, Sun J, Xu B, Li H, 2013. Molecular characterization and oxidative stress response of a cytochrome P450 gene (CYP4G11) from *Apis cerana cerana*. *Z. Naturforsch C.*, 68(11/12): 509–521.

Si A, Helliwell P, Maleszka R, 2004. Effects of NMDA receptor antagonists on olfactory learning and memory in the honeybee (*Apis mellifera*). *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 77(2): 191–197.

Siviter H, Brown MJF, Leadbeater E, 2018. Sulfoxaflor exposure reduces bumblebee reproductive success. *Nature*, 561(7721): 109–112.

Sparks TC, Watson GB, Loso MR, Geng C, Babcock JM, Thomas JD, 2013. Sulfoxaflor and the sulfoximine insecticides: Chemistry, mode of action and basis for efficacy on resistant insects. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 107(1): 1–7.

Tijet N, Helvig C, Feyereisen R, 2001. The cytochrome P450 gene superfamily in *Drosophila melanogaster*: Annotation, intron-exon organization and phylogeny. *Gene*, 262(1/2): 189–198.

Tison L, Hahn ML, Holtz S, Rößner A, Greggers U, Bischoff G, Menzel R, 2016. Honeybees' behavior is impaired by chronic exposure to the neonicotinoid thiacloprid in the feld. *Environ. Sci. Technol.*, 50(13): 7218–7227.

Wang Q, Diao QY, Dai PL, Chu Y, Wu YY, Zhou T, Cai Q, 2017. Exploring poisonous mechanism of honeybee, *Apis mellifera ligustica* Spinola, caused by pyrethroids. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 135: 1–8.

Whalon ME, Mota-Sanchez D, Hollingworth RM, 2008. Global Pesticide Resistance in Arthropods. Wallingford: CAB International. 5–31.

Wu SG, Xu JY, Rao HX, Liu XJ, An XH, Lü L, Guan WB, Zhao XP, 2017. Acute toxicity and risk assessment of pesticides used in strawberry for controlling aphid to honeybees. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 12(2): 222–227. [吴声敢, 徐吉洋, 饶惠仙, 柳新菊, 安雪花, 吕露, 关文碧, 赵学平, 2017. 草莓蚜虫防治用药对蜜蜂的急性毒性与风险评价. 生态毒理学报, 12(2): 222–227.]

Zannat MT, Locatelli F, Rybak J, Menzel R, Leboulle G, 2006. Identification and localisation of the NR1 sub-unit homologue of the NMDA glutamate receptor in the honeybee brain. *Neurosci. Lett.*, 398(3): 274–279.

Zhu YC, Yao J, Adamczyk J, Luttrell R, 2017. Feeding toxicity and impact of imidacloprid formulation and mixtures with six representative pesticides at residue concentrations on honeybee physiology (*Apis mellifera*). *PLoS ONE*, 12(6): e0178421.